ChinaXiv合作期刊

褐藻制备生物乙醇的生产优化研究

郗欣彤 [1,2]，毛绍名*[1,2]

1.中南林业科技大学林业生物技术湖南省重点实验室　湖南长沙　410004
2. 中南林业科技大学生命科学与技术学院　湖南长沙　410004

摘要：褐藻作为第三代生物乙醇生产原料，以其高碳水化合物含量、生产周期短、不与粮争地的优势逐渐被人们所关注。但是在生物乙醇的实际生产中，低成本基础上乙醇产率的提高一直是亟需解决的问题。这篇文章主要针对褐藻制备生物乙醇的技术困难，综述了适用于大规模生产生物乙醇的预处理技术和糖化发酵技术的研究进展，并由此展望褐藻制备生物乙醇的研究发展新方向。

关键词：生物乙醇；褐藻；褐藻胶；酿酒酵母

Optimization of bioethanol production by brown algae

CHI Xin-tong[1,2]，　MAO Shao-ming[1,2]

1.Forestry Biotechnology Hunan Key Laboratories，Hunan Changsha，410004，China

2. College of Life Sciences and Technology，　Central south university of forestry and technology，Hunan Changsha，410004，China

Abstract： As the third-generation bioethanol feedstocks, brown algae have received attention because of advantages with high carbohydrate content, short production cycle and haven't compete with grain for land. However, the improvement of ethanol yield on the basis of low cost is an urgent problem in the actual production of bioethanol. This article focused on the technical difficulties of large-scale bioethanol production from brown algae, reviewed the research progress of the pretreatment technology and the saccharification and fermentation technology, it also prospects the new potential trend of brown algae bioethanol.

Key words: Bioethanol, Brown algae, Alginate, *Saccharomyces cerevisiae*

1. 引言

生物燃料与传统化石燃料相比除了在节能减排上的优点外，更关键的优势在于对自然资源的合理利用、能源生产独立和能源供应安全。作为21世纪的“绿色能源”，全世界生物乙醇的生产应用越来越广泛，美国和巴西分别利用玉米和甘蔗生产生物乙醇，欧洲地区国家常以甜菜为主要原料。生物乙醇优势是燃烧性能好，污染物排放少，并且生产原料可以是任何含有大量碳水化合物并能够降解转化为可发酵糖类的植物[1]，因此能够因地制宜选择合适原料。但由于第一二代生物乙醇生产原料分别以粮食作物和林木质纤维素植物为主，容易在我国造成“与人争粮、与粮争地”的社会局面，因此藻类作为第三代生产原料逐渐受到人们青睐。

藻类植物与第二代生物乙醇生产原料林木质纤维素类植物相似，但因为海水的浮力能够使其垂直生长，所含有的木质素含量要远低于林木质纤维素类植物；并且光合效率较高，繁殖周期较短，生长速率是陆地植物的5-10倍[2]；其适应能力强，能够在复杂的水生环境下生长，某些藻类甚至可以从市政废水中获得氮、磷等营养物质[3]，减少了淡水资源的使用和农业土地资源的占用[4]；作为海洋生态系统中的初级生产者，藻类能够吸收大量有机元素，通过高效的光合作用积累有机物，并且能够固定二氧化碳释放氧气；同时可作为其他海洋生物的栖息地，能够优化海洋生态结构、丰富海洋生物多样性[5]；而且能够减轻海洋富营养化现象并降低赤潮出现的风险，这有助于海洋生态修复和营养控制[6]。据统计，以藻类作为原

收稿日期：　　　　**修回日期：**
基金项目：国家自然科学基金资助项目（No.31200074），湖南省教育厅科研重点项目（No.15A198）
*通讯作者，电子信箱：msm526@163.com

chinaXiv:201711.02673v1

料生产生物乙醇的获得产率要高于其他原料，其最高产率是甘蔗的两倍、玉米的五倍[7]。

2. 生产乙醇的海藻种类

我国的海洋资源非常丰富，由于褐藻在温带地区分布广泛，我国已成为养殖生产褐藻最多的国家之一。用于生产生物乙醇的褐藻主要集中于海带、马尾藻、岩衣藻和团扇藻等品种，除褐藻之外，还有部分红藻如江蓠和长心卡帕藻、绿藻如浒苔和石莼也同样被应用于生物乙醇的生产。应用于生物乙醇生产的具有代表性的部分藻类品种列于表 1.

表 1.生产生物乙醇的不同藻类品种

Table1. Different species of algae to produce bioethanol

藻类品种	预处理方式	还原糖产率	发酵菌株	生物乙醇产率	参考文献
褐藻					
Saccharina japonica(海带)	0.06%H_2SO_4, 170℃， 20min	29.10%	*Saccharomyces cerevisiae*	6.65g/L	[18]
Padina tetrastromatica (四叠团扇藻)	1% H_2SO_4,121℃, 45min	0.32g/g	*S.cerevisiae*	0.66g/g	[19]
Sargassum vulgare (普通马尾藻)	2% H_2SO_4,121℃, 45min	0.44g/g	*S.cerevisiae*	0.38g/g	[19]
Sargassum ilicifolium （冬青叶马尾藻）	1% H_2SO_4,121℃, 海洋菌群处理 15min	11.44g/L	*Meyerozyma guilliermondii*	2.74g/L	[35]
Ascophyllum nodosum (岩衣藻)	0.2M H_2SO_4 , 121°C , 20 min. 50°C,150 rpm 搅拌酶解 18 h	15.45g/L	*Scheffersomyces (Pichia) stipitis*	2.4 g/L	[34]
Laminaria Digitata (掌状昆布)	0.2M H_2SO_4 , 121°C,20 min. 50°C，150 rpm 搅拌 18 h 酶解	29.3 g/L	*Kluyveromyces marxianus*	6.0 g/L	[34]
红藻					
Gracilaria corticata （江蓠）	1% H_2SO_4,121℃, 海洋菌群处理 15min	9.25g/L	*M.guilliermondii*	1.72g/L	[35]
Kappaphycus alvarezii （长心卡帕藻）	180 mM H2SO4 , 140°C,5 min.	38.3 g/L	*K.marxianus*	16.0g/L	[8]
绿藻					
Ulva prolifera （浒苔）	0.2%H_2O_2, 50℃, pH=4,12h	0.42g/g	*S.cerevisiae*	31.4%	[9]
Ulva fasciata （石莼）	离子液处理 24h.40℃, pH=4,酶解 24h	112mg/g	*S.cerevisiae*	0.47g/g	[10]

藻类含有丰富碳水化合物，但是其组成成分因种类的不同而差异很大。碳水化合物中褐藻主要以褐藻胶、甘露醇和昆布多糖为主，而红藻内主要是琼胶、卡拉胶和木聚糖，绿藻内主要是纤维素和孔石莼多糖。另外绿藻中所含有的脂质成分是三者之中最多的。由于绿藻内的碳水化合物含量要低于红藻和褐藻，因此在生物乙醇的生产中研究相对较少。而红藻内的琼脂糖并不像褐藻中的甘露醇易溶于水，且水解容易产生不易被发酵利用的单糖，并且红藻中的卡拉胶也需要特殊的微生物提供降解酶，因而存在一定降解难度[11]。作为一种重要的经济型海藻，褐藻在我国的养殖利用历史悠久，主要生长于温带沿海地区，在各个海域都有分布。因此采用褐藻生产生物乙醇在繁殖培育和总量上都更具有优势。

3. 褐藻主要组成成分

褐藻内主要的碳水化合物包括褐藻胶（Alginate）、甘露醇（D-mannitol）、昆布多糖（Laminarin）和纤维素（Cellulose）等。其中含量最多的是褐藻胶，在不同海藻中所占比重

chinaXiv:201711.02673v1

高达30%~60%[12]，而纤维素所占比重相对较少。褐藻胶和纤维素形成了细胞壁的主要结构多糖。在褐藻细胞中褐藻胶更多地暴露在细胞壁中，纤维素则嵌入褐藻胶的结构网络中并以少数共价键与之相连接，因此褐藻胶经预处理后的转化速率明显高于纤维素[13]。

褐藻胶主要是由L-古罗糖醛酸和D-甘露糖醛酸以不同比例通过1,4-糖苷键链接形成的线性共聚物[14]。这个比例取决于褐藻的种类、分布以及生长季节。褐藻胶裂解酶能够通过β-消除反应断裂褐藻胶分子内的糖苷键，内切型褐藻胶裂解酶可以降解产生不饱和低聚糖，而外切型褐藻胶裂解酶能将褐藻胶进一步降解为糖醛酸单体化合物，即4-脱氧-L-赤藓-糖醛酸(4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid, DEH)。在含有褐藻胶裂解酶的海洋微生物中，DEH被还原酶降解、磷酸化后进入恩特纳-杜德洛夫代谢途径(ED途径)转化为可被微生物利用的丙酮酸和3-磷酸甘油醛[15]。

甘露醇具有良好的水溶性，将甘露醇单独用于制备生物乙醇时不需进行预处理，但甘露醇不容易被微生物发酵利用。甘露醇需要经氧化成果糖后才能进一步利用，而这个转化反应产生的NADH需要在有氧条件或在转氢酶的存在下才能转变为NADPH。因此甘露醇不能在严格厌氧条件下被微生物利用，需要采用微氧发酵条件[16]。

目前以褐藻为原料生产乙醇的主要技术难点在于：(1)褐藻内褐藻胶和甘露醇的降解利用困难，导致其所含丰富的碳水化合物得不到充分利用；(2)多种糖类无法同时有效地进行糖化发酵生产。褐藻胶需要特殊的降解酶进行有效降解，而甘露醇的特殊性要求糖化发酵的微生物必须有相应代谢途径，多种糖类同时降解也对发酵微生物提出严格要求。因此在乙醇发酵生产中的优化处理主要集中在预处理和糖化发酵。

4. 褐藻生产生物乙醇优化处理研究进展

4.1 预处理技术

藻类细胞的刚性细胞壁不易被破坏，并且在发酵过程中能被微生物直接利用的糖类含量较少，必须要通过预处理来提高初始发酵液中的糖含量[17]。藻类生物的软组织含水量较高，藻体较为柔软，比林木质纤维素生物质更容易进行预处理，同时也容易降低前期生产成本。目前藻类预处理技术主要包括物理预处理法、化学预处理法和生物预处理法，但是在褐藻生产生物乙醇的实际应用中最常用的是酸处理和生物酶处理。

4.1.1 酸预处理

目前在工业生产中被广泛采用的是稀酸预处理法。由于浓酸作用时间长易造成反应器的腐蚀，对设备要求高，并且酸液回收较为困难，因此价格低廉、反应时间短的稀酸处理技术成为预处理的最佳选择。Lee等[18]采用极低酸水热法对海带（*S.japonica*）进行预处理，用0.06%稀硫酸在170℃预处理20min后收集得到处理液中葡萄糖含量达29.10%，是未进行预处理的四倍。Durbha等[19]将四叠团扇藻（*P.tetrastromatica*）用1%稀硫酸于121℃处理45min后经酿酒酵母*S.cerevisiae*发酵生产所获得的乙醇产率为0.66g/g。Ravanal等[20]首次将巨藻中的褐藻胶和纤维素同时糖化，并对比不同预处理方法所获得的葡萄糖产率。采用2%稀硫酸预处理1h后的处理液加入纤维素复合酶和褐藻胶裂解酶，并分别在pH5.2、50℃和pH7.5、37℃下酶解糖化处理4h、2h以求达到最佳酶解效果，最终葡萄糖和糖醛酸得率分别为68.4wt.%、85.8wt.%。而未预处理直接酶解糖化所获得葡萄糖和糖醛酸的收率却仅为6.4 wt.%、18.3 wt.%。

但最近Wang等[21]提出酸性预处理不适用于褐藻胶单体糖化发酵生产乙醇的看法。Wang等[21]使用1%（w/v）稀硫酸在120℃下对褐藻胶单体预处理30min，同未经预处理的褐藻胶一起经相同褐藻胶裂解酶酶解后，预处理所获还原糖产量要比与未经预处理获得产量高出7.5%，但这数值要低于研究者的期望值。分析发现褐藻胶酸性预处理和酶解过程分别会产生饱和单体（甘露糖醛酸和古罗糖醛酸）、不饱和单体（DEH），而发酵微生物无法同时代谢这些不同的单体，并且甘露糖醛酸和古罗糖醛酸也很难被微生物发酵利用。

chinaXiv:201711.02673v1

chinaXiv:201711.02673v1

由于酸性预处理技术对后续酶解糖化效率的提高所贡献的作用较小，同时产生多种不易被发酵的单体化合物，因此 Wang 等[21]认为褐藻胶不适合采用酸性预处理技术。

4.1.2 混合酶预处理

除了稀酸预处理外，酶解法也常被考虑作为有效的降解方法，尤其是能够对褐藻胶和其他多糖进行充分降解。但一种酶单独酶解预处理藻类多糖的效率较低，在研究中常将多种酶组合应用于预处理。Sharma 等[22]研究发现，纤维素酶与褐藻胶裂解酶按 9:1 比例混合形成的酶混合物能够有效释放葡萄糖和甘露醇。并且在酶解 5-20h 期间，甘露醇的释放量开始升高，经历 7h 的潜伏期后混合酶所释放的总糖量要高于纤维素酶单独酶解所释放的糖量。干物质含量为 25%（w/v）时混合酶所释放的葡萄糖和甘露醇的总糖量达到 74g/L。最近有研究者通过筛选海洋微生物和构建重组酶生产菌株来完成对原料更有效的多酶混合降解。Manns 等[23]将从鞘氨醇单胞菌和黄杆菌属中分离出的两种褐藻胶裂解酶在大肠杆菌中进行重组表达，并结合真菌纤维素酶对褐藻进行酶解研究发现，褐藻中的葡萄糖和甘露醇的糖回收率达 90%以上，并对褐藻内所含有的其他成分岩藻多糖也具有一定降解作用。Mohapatra[24]从马尾藻中筛选分离出能够同时生产褐藻胶裂解酶和纤维素酶的微小杆菌 *Exiguobacterium sp.*Alg-S5，分析发现所产褐藻胶裂解酶和纤维素酶活性在 pH7.5、温度分别为 40℃和 45℃时达到最佳状态，在 55℃时两种酶的相对酶活性也都能够保持在 40%以上。两种酶的酶产量在培养 60-72h 内都逐渐达到最大值，并且产酶时间可持续至 122h。自然产酶微生物和所构建的重组酶菌株在实际生产中研究较少，对后续发酵的影响还有待深入研究。

褐藻中包含褐藻胶、甘露醇、昆布多糖和纤维素等不同碳水化合物，将多种糖类通过单一预处理形式有效降解从而提高可发酵糖产量的可能性较小。虽然酶解法能够更温和、更有效的降解褐藻胶，但带来的高成本也增加了工业化生产的困难。因此将多种预处理方法相结合或许更适用于褐藻的预处理。第二代林木纤维素乙醇的研究已经比较成熟，辐射法因为经济性和高效性已经被广泛应用于林木纤维素乙醇的生产中，但是在褐藻预处理中应用还是较少。

4.1.3 辐射预处理

传统的物理预处理方法如机械法和研磨法都能够通过改变原材料的比表面积以提高后续酶解糖化的效率，但其缺点在于能耗大、对酶解效率的提高较少，并不适合实际生产。极具吸引力的高能辐射能够通过微波、γ 射线、电子束等物理射线对生物质进行预处理。辐射所需的能耗低于传统物理预处理方法、不会产生发酵抑制物，同时相对于化学预处理方法而言也不会产生腐蚀作用，不需要考虑溶剂大量的使用和回收问题，并且在下游生产中不需中和冷却等多余的生产工艺。Bak 等[25]对稻秆进行电子束辐射（Electron beam irradiation,EBI）预处理后采用真菌同步糖化发酵生产生物乙醇，48h 后最终所得的产率为 57.2%，此时未经过 EBI 预处理的原料发酵生产的乙醇产率仅有 22.7%。当发酵时间被延长至 144h，未经 EBI 预处理的原料发酵得到乙醇产率的最大值也仅为 25.8%，而经过 EBI 预处理后的最终乙醇产率则增长至 72.3%，是未预处理样本的 2.8 倍。

辐射预处理法能够结合其他预处理方法一起使用，并且能够根据不同原料调整辐射剂量，达到最佳优化效果。Chung 等[26]将 γ 射线辐射和酸处理法相结合，在 121℃下用 3%（w/w）稀硫酸预处理杨树皮 60min，然后将其暴露在不同剂量的 γ 射线下，在剂量为 1000kGy 的射线辐射下所获得最大还原糖产量为 83.1%。单独使用 1000kGy 剂量的辐射预处理和稀酸预处理分别获得还原糖产量为 51.5%、56.1%。辐射预处理法与其他预处理方法的结合能够显著降低纤维素的结晶度，明显提高还原糖的产量。Lee 等[27]采用电子束辐射和稀酸相结合的二级预处理技术对红麻杆芯进行预处理，在 120℃下经 3%稀硫酸预处理 5h 后，红麻杆芯又经辐射预处理（辐射剂量 500kGy），分析发现半纤维素含量由 25.43%显著下降至 1.39%。在经过电子束辐射和稀酸相结合的二级预处理、72h 的酶解处理后，所获得还原糖产量达到

73.6%，要远高于未经预处理（36.9%）、单独电子束辐射预处理（40.6%）和单独稀酸预处理（44.0%）的产量。

目前以褐藻为原料的乙醇生产中也有研究者使用辐射法与其他方法相结合，以减少抑制化合物的形成或增加后续酶解效率。Yuan 等[28]利用微波加热代替热水预处理来辅助稀酸对岩衣藻(*A.nodosum*)的预处理，从而减少了抑制物的生成。而 Yoon 等[29]采用 500kGy 剂量的 γ 射线进行辐射预处理，褐藻(*Undaria sp.*)的还原糖含量从 0.017g/L 增至最大值 0.048g/L；而 121℃下 1%稀硫酸处理褐藻 180min 所获得的还原糖最大含量甚至低于 0.04g/L。但将以上两种预处理方法结合后，所获得的还原糖含量高达 0.235g/L，这也充分说明辐射法在褐藻预处理中的可行性。γ 射线能够破坏褐藻的细胞结构释放大量水解产物，但是 γ 射线对褐藻胶的影响还有待探究，在目前预处理的创新上可作为一个改进点。

4.2 糖化发酵技术

4.2.1 糖化发酵方法的选择

分步糖化发酵(separate hydrolysis and fermentation, SHF)是将糖化和发酵单独反应，能够通过控制生产条件使酶解和发酵效率达到最佳，同时也容易产生后续微生物代谢活性的抑制物。同步糖化发酵(simultaneous saccharification and fermentation, SSF)可以在同一个反应器中同时进行糖化和发酵，能减少水解产物对发酵生产的抑制作用，但效率不容易达到最佳。

Hou 等[30]对不同浓度（5%、10%）的昆布（*L.digitata*）基质分别采用 SSF 和 SHF 进行发酵，SHF 发酵法要比 SSF 发酵法高出 38%-40%的产率，这可能是由于 SSF 过程中酶解的效率较低。但随着底物浓度的增加，SHF 的生产效率也有所下降，主要原因在于发酵过程中出现的产物抑制现象。而 Jelynne 等[31]将马尾藻（*Sargassum sp.*）经过稀酸预处理后用酿酒酵母分别进行 SSF 和 SHF 发酵，对比发现 SSF 的乙醇转化率为 66.9%，而 SHF 的转化率仅为 34.1%。SSF 和 SHF 的转化效率可能受到了生产过程中其他因素影响，不能简单绝对地比较两者效率的高低。

但由于 SSF 所需设备简单，生产周期较短，还能够减少微生物污染的影响，更适用于藻类大规模生产，大多数研究者也都在褐藻生产生物乙醇的研究中采用同步糖化发酵法，但是 SSF 的缺点在于会出现酶解温度与发酵温度不一致的问题，在后续研究中有待进一步解决。

4.2.2 天然发酵微生物的选择

在褐藻中难以被降解利用的除了褐藻胶还有甘露醇，只有少数微生物可以利用转化甘露醇，并且在转化途径中产生了氧化还原反应，这可能会导致额外的还原当量 NAD(P)H 不断积累[32]，容易造成一种不平衡的氧化还原发酵条件[33]。在常见的乙醇发酵微生物中，棕榈发酵细菌(*Zymobacter palmae*)只能发酵甘露醇，马克斯克鲁维酵母(*K.marxianus*)和嗜鞣管囊酵母(*Pacchysolen tannophilus)*只能发酵海带多糖，而毕赤酵母(*Pichia angophorae*)可以同时发酵甘露醇和海带多糖[34]。Obata 等[35]研究发现马克斯克鲁维酵母在发酵 30h 后乙醇产量达到最高，并消耗了 52%的可利用糖类。毕赤酵母对褐藻内糖类的利用更为充分，但是反应时间较长，发酵 144h 后才达到和马克斯克鲁维酵母相同的产量。Sudhakar 等[36]认为利用海藻的微生物也应具有一定耐盐性，并利用海洋酵母(*M.guilliermondii*)发酵经 1%(v/v)硫酸（121℃,15min）和海洋菌群（包括纤维素降解海洋细菌与褐藻胶降解细菌）共同处理的新鲜褐藻 *S.ilicifolium*，乙醇产量最高达 2.74±0.78g/L。

最近又有研究者发现能够降解利用甘露醇的天然微生物，同时该微生物还能够降解利用褐藻胶。Ji 等[37]发现的 *Defluviitalea phaphyphila* 是第一种被鉴定出能直接利用褐藻发酵生产乙醇的嗜热细菌，能够同时以葡萄糖、甘露糖和褐藻胶降解后的糖醛酸为原料发酵生产乙醇。*D.phaphyphila* Alg1 是一种呈杆状的革兰氏阴性专性厌氧发酵代谢菌，最佳生长温度在 55-60℃，可以利用除蔗糖、木糖以外的多种糖类。相对其他发酵微生物，*D.phaphyphila* Alg1

chinaXiv:201711.02673v1

chinaXiv:201711.02673v1

菌株对甘露醇利用则更为高效。同时 *D.phaphyphila* 是耐热菌株，实验表明在 60℃时对葡萄糖和褐藻胶的利用生产效率要高于 45℃。对 *D.phaphyphila* Alg1 的基因组结构分析表明，该菌种含有一套完整的参与褐藻代谢的基因组，有三个关键基因簇和诸多关键基因参与了褐藻胶、甘露醇以及海带多糖的降解[38]。但最重要的表型特征是在高温下降解褐藻胶的能力，而且这个嗜热菌株内褐藻胶降解系统也包括了许多新的耐热褐藻胶裂解酶和独特的 1-磷酸甘露醇脱氢酶。因此在理论上可以作为褐藻发酵生产乙醇的理想菌株。

在考虑到褐藻内碳水化合物降解难度的同时，同步糖化发酵的劣势也需要克服。同步糖化发酵反应器中的温度常常高达 50℃，普通酶的最佳酶解温度则在 30~37℃[39]，两者之间的差别可能极大地影响最终乙醇产量。耐高温菌株的使用能显著降低冷却成本、减少细菌污染风险、有效提高发酵速率和产物得率。因此 SSF 的优化依赖于具有高发酵力和耐热微生物的应用[40]。

酿酒酵母因其良好的乙醇耐受性常作为发酵生产的首选菌株，但最近也有研究者认为酿酒酵母实际上可能并不适合藻类发酵生产乙醇[35]。酿酒酵母对乙醇的耐受能力随着温度的升高反而有所下降，最大发酵能力在 37℃左右[39]。Castro 等[40]通过对比实验发现酿酒酵母在温度从 30℃增加到 45℃后，乙醇的产率减少了 35%。而随着温度从 30℃逐渐升高至 45℃，耐高温的马克斯克鲁维酵母发酵生产的产率却随之增加，马克斯克鲁维酵母在 45℃时对 20g/L 葡萄糖的最大利用率为 2.9g/L/h。Costa 等[39]比较了酿酒酵母和马克斯克鲁维酵母在不同温度和不同葡萄糖浓度下的同步糖化发酵能力,马克斯克鲁维酵母在 45℃时利用不同浓度即 2%，4%，8%以及 16%(w/v)的葡萄糖，酿酒酵母只能利用浓度为 8%和 16%(w/v)的葡萄糖培养基。酿酒酵母不具有耐高温特性，发酵反应器中较高的温度容易使酿酒酵母生产效率降低，造成生物乙醇产量的减少。但是考虑到菌株的乙醇耐受性，马克斯克鲁维酵母的乙醇耐受性却不如酿酒酵母，在生产过程中随着乙醇浓度升高可能会造成马克斯克鲁维酵母发酵能力的改变。并且马克斯克鲁维酵母对多糖的降解利用具有局限性，不能对褐藻进行更高效的利用。

4.2.3 基因工程菌株的构建选择

很少有天然微生物能够满足耐高温、耐乙醇并且还有良好降解发酵能力的要求，最新发现的 *D.phaphyphila* 似乎是一种理想的发酵菌株，但相关研究还处于起步阶段，还需要进行大量的优化实验才能应用于实际生产。因此在大规模生产中构建基因工程菌对不同原料进行针对性降解利用，可以达到最佳发酵效果。

常用来构建基因工程菌的宿主菌包括大肠杆菌和酿酒酵母。大肠杆菌不含降解褐藻胶和甘露醇的代谢途径，但却是作为构建基因工程菌的良好宿主。酿酒酵母中不具备可以代谢褐藻胶或其单体 DEH 的基因，因此相对容易将其他基因整合至酿酒酵母中，而且酿酒酵母对乙醇的耐受性也更有利于乙醇生产[41]。

Wargacki 等[42]将大肠杆菌的染色体与褐藻胶裂解酶等关键酶基因融合，并建立了可直接利用褐藻胶发酵生产乙醇的工程菌，使乙醇产率达到理论值的 80%。改造后的大肠杆菌通过降解褐藻胶不仅能够为乙醇发酵生产提供额外的糖源，同时还能够平衡由甘露醇代谢所产生的多余还原当量，实现了多种糖类同步发酵生产乙醇。但 Lee 等[43]认为，在重组大肠杆菌菌株中还应注意糖醛酸还原酶的功能性表达，因为在大肠杆菌中大量还原酶容易表达为不溶形式或者酶活性较低。作为乙醇生产菌株，不仅要具有较高的乙醇耐受性，同时为了充分利用甘露醇和褐藻胶、增加生物乙醇的产量，在微生物中的恩特纳-杜德洛夫代谢途径(ED)、糖酵解(EMP)等代谢途径也需要进行重组和优化。Enquist-Newman 等[12]使用酿酒酵母结合关键基因如产褐藻胶裂解酶基因构建基因工程菌，能利用褐藻胶降解后的单体 DEH 生产生物乙醇，产量可达到理论值的 83%，但是不能直接降解褐藻胶。Takagi 等[44]将来自海洋细菌 *Saccharophagus degradans* 的褐藻胶裂解酶基因与酿酒酵母基因组相结合，成功构建

chinaXiv:201711.02673v1

了酿酒酵母表面内切型和外切型褐藻胶裂解酶共展示系统，这要比任何单一褐藻胶裂解酶的降解效率都要高。酵母表面展示系统能够集表达、纯化、固定于一体，减少操作步骤，同时这种表面展示的酶还能够被重复利用。之后 Motone 等[45]同样从 *S.degradans* 2-40 中分离出海带多糖酶 Gly5M 构建酿酒酵母表面展示系统，并利用该系统直接降解、吸收褐藻中的海带多糖发酵生产乙醇。

5.总结与展望

在褐藻生产乙醇的优化中，最重要的技术难点是预处理和同步糖化发酵工艺的优化。而两者面临的主要挑战在于实现预处理的低成本和高效率，构建耐高温、耐乙醇并适合褐藻降解发酵的基因工程菌。目前使用酸和混合酶对褐藻进行预处理的技术已经比较成熟，同时也在开发利用多种预处理方法的联合使用或采用其他预处理方式来提高褐藻生产乙醇的效率。而且研究者除了通过构建新的基因工程菌以利用褐藻内褐藻胶和甘露醇，还不断发现适合两者降解的天然微生物。

虽然目前以褐藻制备生物乙醇的研究较多，但在技术层面上还需要不断提高，今后的研究将主要集中于以下方面：

(1) 改进预处理方式：林木纤维素乙醇采用的低成本预处理方法如辐射法已经全面推广，但在褐藻生产中的可行性还需要不断探究，并且还需要不断结合其他酶解或化学预处理方法进行优化研究。

(2) 天然微生物的发现与研究：新发现的海洋微生物中存在对褐藻胶和甘露醇降解的天然途径，并且在生物乙醇生产中表现出良好耐热性，这将吸引人们发现更多适合生物乙醇生产的天然微生物，天然微生物生产乙醇的效率也需不断提高。

(3) 基因工程菌株的构建：虽然酿酒酵母不耐高温，没有甘露醇和褐藻胶的天然降解途径，但是作为优良性能的宿主菌和工业化乙醇发酵生产菌株菌，是构建基因工程菌的首选。而其他天然微生物，在基因工程菌的构建上仍需要进行不断深入研究，将关键降解基因、耐高温基因等基因与乙醇发酵菌株共表达，构建生物乙醇高效生产菌株。

(4) 采用多种微生物菌株共同处理：由于褐藻内碳水化合物的多样性，单一微生物难以对褐藻进行高效降解和发酵利用。不仅天然微生物难以同时利用其中褐藻酸、甘露醇和昆布多糖等碳水化合物，就连基因工程菌株也存有缺陷。因此将多种天然微生物菌株或基因工程菌株混合利用将能够最大化降解褐藻内碳水化合物、提高生物乙醇发酵效率。

随着工艺技术的不断创新与突破，将会极大提高褐藻生产乙醇的效率，褐藻生物乙醇的应用也将产生极大的经济、社会和环境效益。

参考文献

[1] Nigam P S, Singh A. Production of liquid biofuels from renewable resources[J]. Progress in Energy & Combustion Science, 2011, 37(1):52-68.

[2] Kroger M, Muller-Langer F. Review on possible algal-biofuel production processes [J]. Biofuels 2012, 3(3), 333-349.

[3] John R P, Anisha G S, Nampoothiri K M, et al. Micro and macro algal biomass: a renewable source for bioethanol[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(1): 186-193.

[4] Schmidt B J, Lin-Schmidt X, Chamberlin A, et al. Metabolic systems analysis to advance algal biotechnology[J]. Biotechnology Journal, 2010, 5(7): 660-670.

[5] Rebours C, Marinho-Soriano E, Zertuche-Gonzalez J A, et al. Seaweeds: an opportunity for wealth and sustainable livelihood for coastal communities[J]. Journal of Applied Phycology,

2014, 26(5): 1939-1951.
[6] Vassilev S V, Vassileva C G. Composition, properties and challenges of algae biomass for biofuel application: An overview[J]. Fuel, 2016, 181: 1-33.
[7] Zhang W, Zhang J, Cui H, et al. The Isolation and Performance Studies of an Alginate Degrading and Ethanol Producing Strain[J]. Chemical and Biochemical Engineering Quarterly, 2014, 28(3): 391-398.
[8] Ra C H, Nguyen T H, Jeong G T, et al. Evaluation of hyper thermal acid hydrolysis of Kappaphycus alvarezii for enhanced bioethanol production.[J]. Bioresource Technology, 2016,209: 66-72.
[9] Li Y P, Cui J F, Zhang G L, et al. Optimization study on the hydrogen peroxide pretreatment and production of bioethanol from seaweed Ulva prolifera biomass.[J]. Bioresource Technology, 2016, 214: 144-149.
[10] Trivedi N, Reddy C R K, Radulovich R, et al. Solid state fermentation (SSF)-derived cellulase for saccharification of the green seaweed Ulva for bioethanol production[J]. Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts, 2015, 9: 48-54.
[11] Abdallah Q A, Nixon B T, Fortwendel J R. The Enzymatic Conversion of Major Algal and Cyanobacterial Carbohydrates to Bioethanol[J]. Frontiers in Energy Research. 2016, 4:36.
[12] Enquist-Newman M, Faust A M E, Bravo D D, et al. Efficient ethanol production from brown macroalgae sugars by a synthetic yeast platform[J]. Nature, 2014, 505(7482): 239-243.
[13] Deniaud-Bouet E, Kervarec N, Michel G, et al. Chemical and enzymatic fractionation of cell walls from Fucales: insights into the structure of the extracellular matrix of brown algae[J]. Annals of Botany, 2014, 114(6): 1203-1216.
[14] Lee K Y, Mooney D J. Alginate: properties and biomedical applications [J]. Progress in Polymer Science, 2012, 37(1): 106-126.
[15] Wang D, Kim D H, Kim K H. Effective production of fermentable sugars from brown macroalgae biomass[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2016, 100(22):9439-9450.
[16] Fasahati P, Woo H C, Liu J J. Industrial-scale bioethanol production from brown algae: Effects of pretreatment processes on plant economics[J]. Applied Energy, 2015, 139:175-187.
[17] Sirajunnisa A R, Surendhiran D. Algae – A quintessential and positive resource of bioethanol production: A comprehensive review.[J]. Renewable & Sustainable Energy Reviews, 2016, 66: 248-267.
[18] Lee J Y, Li P, Lee J, et al. Ethanol production from Saccharina japonica using an optimized extremely low acid pretreatment followed by simultaneous saccharification and fermentation[J]. Bioresource Technology, 2013, 127: 119-125.
[19] Durbha S,Dev Tavva S,Guntuku G, et al. Ethanol Production from the Biomass of Two Marine Algae, Padina tetrastromatica and Sargassum vulgare.[J]. American Journal of Biomass and Bioenergy, 2016, 5(1): 31-42.
[20] Ravanal M C, Pezoa-Conte R, von Schoultz S, et al. Comparison of different types of pretreatment and enzymatic saccharification of Macrocystis pyrifera for the production of biofuel[J]. Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts, 2016, 13: 141-147.
[21] Wang D, Yun E J, Kim S, et al. Efficacy of acidic pretreatment for the saccharification and fermentation of alginate from brown macroalgae.[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2016, 39(6): 959-966.
[22] Sharma S, Horn S J. Enzymatic saccharification of brown seaweed for production of

chinaXiv:201711.02673v1

fermentable sugars[J]. Bioresource Technology, 2016, 213: 155-161.
[23] Manns D, Andersen S K, Saake B, et al. Brown seaweed processing: enzymatic saccharification of Laminaria digitata requires no pre-treatment[J]. Journal of Applied Phycology, 2015, 28(2): 1287-1294.
[24] Mohapatra B R. Kinetic and thermodynamic properties of alginate lyase and cellulose coproduced by Exiguobacterium species Alg-S5.[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 98: 103-110.
[25] Bak J S. Downstream optimization of fungal-based simultaneous saccharification and fermentation relevant to lignocellulosic ethanol production[J]. SpringerPlus, 2015, 4(1): 47.
[26] Chung B Y, Lee J T, Bai H W, et al. Enhanced enzymatic hydrolysis of poplar bark by combined use of gamma ray and dilute acid for bioethanol production[J]. Radiation Physics and Chemistry, 2012, 81(8): 1003-1007.
[27] Lee B M, Jeun J P, Kang P H,et al. Enhanced enzymatic hydrolysis of kenaf core using irradiation and dilute acid[J]. Radiation Physics and Chemistry, 2017, 130: 216-220.
[28] Yuan Y, Macquarrie D J. Microwave Assisted Acid Hydrolysis of Brown Seaweed Ascophyllum nodosumfor Bioethanol Production and Characterization of Alga Residue[J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2015, 3(7): 1359-1365.
[29] Yoon M, Choi J I, Lee J W, et al. Improvement of saccharification process for bioethanol production from Undaria sp. by gamma irradiation[J]. Radiation Physics and Chemistry, 2012, 81(8): 999-1002.
[30] Hou X, Hansen J H, Bjerre A B. Integrated bioethanol and protein production from brown seaweed Laminaria digitata[J]. Bioresource Technology, 2015, 197: 310-317.
[31] Jelynne P, Tamayo, Del Rosario EJ. Chemical analysis and utilization of Sargassum sp. as substrate for ethanol production[J]. EnergyEnviron,2014, 5(2):202-208
[32] Wei N, Quarterman J, Jin Y S, et al. Marine macroalgae: an untapped resource for producing fuels and chemicals[J]. Trends in Biotechnology, 2013, 31(2): 70-77.
[33] Song M Y, Pham H D, Seon J Y, et al. Marine brown algae: a conundrum answer for sustainable biofuels production.[J]. Renewable & Sustainable Energy Reviews, 2015, 50: 782-792.
[34] Jung K A, Lim S R, Kim Y, et al. Potentials of macroalgae as feedstocks for biorefinery[J]. Bioresource Technology, 2013, 135: 182-190.
[35] Obata O,Akunna J, Bockhorn H, et al. Ethanol production from brown seaweed using non-conventional yeasts[J]. Bioethanol, 2016, 2(1): 134-145.
[36] Sudhakar M P, Jegatheesan A, Poonam C, et al. Biosaccharification and ethanol production from spent seaweed biomass using marine bacteria and yeast.[J]. Renewable Energy, 2017, 105:133-139.
[37] Ji S Q, Wang B, Lu M, et al. Direct bioconversion of brown algae into ethanol by thermophilic bacterium Defluviitalea phaphyphila[J]. Biotechnology for Biofuels, 2016, 9(1):81
[38] Ji S Q, Wang B, Lu M, et al. Defluviitalea phaphyphila sp nov., a Novel Thermophilic Bacterium That Degrades Brown Algae[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(3): 868-877.
[39] Costa D A, De Souza C J A, Costa P S, et al. Physiological characterization of thermotolerant yeast for cellulosic ethanol production[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014,

chinaXiv:201711.02673v1

98(8): 3829-3840.
[40] Castro R C A, Roberto I C. Selection of a Thermotolerant Kluyveromyces marxianus Strain with Potential Application for Cellulosic Ethanol Production by Simultaneous Saccharification and Fermentation[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, 172(3): 1553-1564.
[41] Kawai S, Murata K. Biofuel Production Based on Carbohydrates from Both Brown and Red Macroalgae: Recent Developments in Key Biotechnologies[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(2):145.
[42] Wargacki A J, Leonard E, Win M N, et al. An Engineered Microbial Platform for Direct Biofuel Production from Brown Macroalgae[J]. Science, 2012, 335(6066): 308-313.
[43] Lee O K, Lee E Y. Sustainable production of bioethanol from renewable brown algae biomass[J]. Biomass & Bioenergy, 2016, 92: 70-75.
[44] Takagi T, Yokoi T, Shibata T, et al. Engineered yeast whole-cell biocatalyst for direct degradation of alginate from macroalgae and production of non-commercialized useful monosaccharide from alginate[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 100(4): 1723-1732.
[45] Motone K, Takagi T, Sasaki Y, et al. Direct ethanol fermentation of the algal storage polysaccharide laminarin with an optimized combination of engineered yeasts[J]. Journal of Biotechnology, 2016, 231: 129-135.

chinaXiv:201711.02673v1